尾叶桉 *COMT* 和 *CCoAOMT* 基因定向调控木质素单体合成的烟草转化研究

陈博雯，刘海龙，肖玉菲，覃子海，张烨，张晓宁

（广西壮族自治区林业科学研究院，国家林业局中南速生材繁育实验室，广西优良用材林资源培育重点实验室，广西 南宁 530002）

摘要：目的：利用烟草遗传转化体系，研究尾叶桉（*Eucalyptus urophylla*）咖啡酸氧甲基转移酶基因（*EuCOMT*）和咖啡酰 CoA 氧甲基转移酶（*EuCCoAOMT*）基因对木质素单体合成的定向调控效果。方法：分别利用 *EuCOMT* 的正义片段、*EuCCoAOMT* 的全长 RNAi 片段进行单基因和二价基因的烟草转化研究，并对转基因烟草植株中目标基因表达水平、木质素和纤维素的含量、茎部解剖结构以及木质素单体含量进行检测。结果：分别获得了转基因植株 C-S（转 *EuCOMT* 正义片段）、CR（转 *EuCCoAOMT* 全长 RNAi 片段）、C-CR（*EuCOM* 和 *EuCCoAOMT* 二价基因转化）。烟草中转入的正义 *EuCOMT* 的片段能够正常表达，而 *EuCCoAOMT* 的全长 RNAi 片段对烟草 *CCoAOMT* 基因引发了强烈的抑制。转基因烟草的生长形态、木质素、纤维含量以及解剖结构与野生型无显著差异。转基因植株 C-S 中 G 木质素含量升高 17.72%，S/G 比值降低 17.99%；CR 中 S/G 比值升高 61.62%，C-CR 中 G 木质素降幅达到 57.38%，S/G 比值升幅达到 114.94%。结论：抑制 *CCoAOMT* 对 G 木质素合成具有显著的抑制效果，*EuCOMT* 和 *EuCCoAOMT* 二价基因转化对 S/G 比值的定向调控效果最为理想。

关键词：二价基因转化，木质素单体合成，定向调控，烟草转化

Directional regulation of lignin monomer synthesis in tobacco by using COMT gene and CCoAOMT gene of *Eucalyptus urophylla*

Chen Bo-wen, Liu Hai-long, Xiao Yu-fei, Qin Zi-hai, Zhang Ye, Zhang Xiao-ning

（Guangxi Forestry Research Institute, Key Laboratory of Central South Fast-growing Timber Cultivation of Forestry Ministry of China, Guangxi Key Laboratory of Superior Timber Trees Resource Cultivation, Nanning Guangxi, 530002, China）

Abstract: Directional regulation effect of *Eucalyptus urophylla COMT* gene and *CCoAOMT* gene on lignin monomer synthesis were studied by tobacco transformation system. Transgenic plants C-S(contain sense *EuCOMT* fragment), CR(contain full-length RNAi fragment of *EuCCoAOMT*), C-CR(contain *EuCOM* and *EuCCoAOMT* dual-gene) were obtained, and the expression of sense *EuCOMT* fragment was detected in transgenic tobacco, while the RNAi fragment of *EuCCoAOMT* caused strong inhibition on tobacco *CCoAOMT* gene. The growth morphology, lignin content, fiber content and anatomical structure of transgenic tobacco were not significantly different from those of wild type. The results of lignin monomer detection showed the G lignin content increased 17.72% and

基金项目：国家自然基金项目 31400522，广西林业科技项目（桂林科字[2014]第 33 号），广西林业科技项目（桂林科字[2016]第 11 号）。

作者简介：陈博雯（1983-），女，博士，高级工程师，从事林业生物技术研究。Email:GFRI_BWCHEN@163.COM。

S/G ratio decreased 17.99% in transgenic plant C-S, meanwhile the S/G ratio increased 61.62% in CR. In C-CR, G lignin content decreased 57.38%, and S/G ratio increased 114.94%. The result showed that the inhibition of *CCoAOMT* had a significant inhibitory effect on lignin synthesis in G, and the dual-gene transformation of EuCOMT and *EuCCoAOMT* Showing the best directional regulation effect.

Key words: dual-gene transformation, lignin monomer synthesis，Directional regulation，tobacco transformation

桉树（*Eucalyptus*）是桃金娘科桉属植物的总称，原产地为澳大利亚，自 20 世纪 70 年代初期引种至我国以来，已逐渐成为南方人工用材林的重要造林树种[1,2]。其中，尾叶桉 GLU4 无性系（*Eucalyptus urophylla* clone GLU4）因其纤维素含量、纤维素长度等制浆指标显著优于其他桉树品种，成为纸浆材造林首选树种。

近年来，随着桉树育种研究的深入，应用基因工程技术进行木材品质的定向改良，实现用材林提质增效逐渐成为研究前沿。对于纸浆材而言，在不影响其木质素含量，保留其对植物生长的积极意义的同时，通过调控其木质素单体 S/G 比值从而降低脱木素过程中的生产损耗，是提升纸浆材品质的重要研究方向。

COMT 和 CCoAOMT 是木质素单体合成中的两个关键酶，催化底物 3-位点和 5-位点的甲基化反应，COMT 催化的反应位于 CCoAOMT 的下游，两者的主要催化产物分别为 G 木质素单体和 S 木质素单体的前体，这两个酶在合成途径中所处的关键位置，使其成为木质素单体调控的适宜切入点[3]。

在黑麦草和二穗短柄草（*Brachypodium distachyon*）中采用 RNAi 抑制 *COMT* 表达，转基因植株中 G、S 木质素降低[4,5]。在苜蓿中下调 *COMT*，G 木质素含量下降而 S 木质素几乎全部消失[6]。Piquemal 等[7]在玉米中反义抑制 *COMT* 植株中 S 木质素含量急剧降低，并伴随有 5 羟 G 木质素产生。下调 *COMT* 的研究结果充分说明其主要参与了 S、G 木质素单体的合成，结合合成途径推测，上调 *COMT* 可能会促进两种单体的合成，若同时对其下游关键酶进行调控，有望达到定向提高 S/G 比值的效果，但尚未有相关的研究报道。

针对 *CCoAOMT* 的调控研究早在 2000 年即有报道，反义抑制 *CCoAOMT* 的杨树植株中，G、S 木质素同时下降，但对 S/G 的影响还未明确[8]。苜蓿中下调 *CCoAOMT* 后，G 木质素含量下降而 S 木质素含量基本不受影响[6]。魏建华等[9]检测了 3 年生的转反义 *CCoAOMT* 基因杨树制浆性能，木质素含量下降约 13%, G/S 略有增加，转基因杨树的纤维品质有所提高。理论上推测，抑制 *CCoAOMT* 可以阻断“CCoAOMT/CCR”途径的合成，有利于经“CCR/COMT”途径导向 S 木质素合成[5,10,11]，但相关研究结果显示木质素单体合成调控的结果并不一致。这可能与木质素合成的网络性以及替代途径的影响有关。

单一基因的调控效果，可能会被其他基因的功能抵消或掩盖，因此采用多基因共调控的研究策略，逐渐被研究者采纳。Zhou[11]通过杂交获得 *COMT* 和 *CCoAOMT* 同时下调的苜蓿植株，其中部分植株木质素含量下降，但对 S/G 比值未作检测。赵华燕等[12]通过串联启动子将杨树基因 *CCoAOMT* 和 *COMT* 同时反义转化烟草，转基因植株中木质素下降 35%，两个基因单独转化的植株则最多下降 30.2%和 24%。上述研究证实了 *COMT* 和 *CCoAOMT* 在木质素合成中的重要作用，但其研究关注点并未涉及木质素单体合成定向调控。为此，本研究从木质素单体合成定向调控的角度出发，尝试通过上调 *COMT* 和下调 *CCoAOMT* 的二价基因调控策略，探索对单体 S/G 比值定向调控的可能性，为尾叶桉木材品质的定向改造提供最直接有效的研究基础和技术参考。

1. 材料与方法

1. 1 实验材料

烟草无菌组培苗、农杆菌 LBA4404 为本实验室保存。*EuCOMT*（KF467169.1、KF467168.1）和 *EuCCoAOMT*（KF467167.1、KF467166.1）为本实验室在前期研究中自 GLU4 无性系组培苗叶片中克隆所得。在此基础上构建得到的 *EuCOMT* 正义表达载体（pEuCOMT-S）、*EuCCoAOMT* 全长 RNAi 表达载体（pEuCCoAOMT-RNAi）以及 *EuCCoAOMT-EuCOMT* 二价基因表达载体（pEuCCoAOMT-EuCOMT），载体结构如图 1。

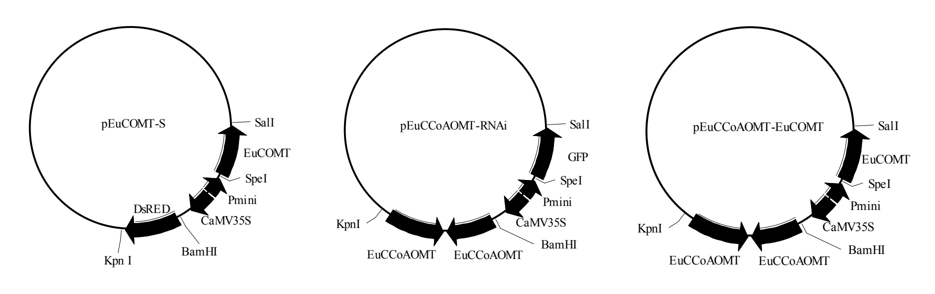


图 1 表达载体结构示意图

Figure 1 Schematic of expression vectors

Ex-Taq 聚合酶、RNA LA PCR 反转录试剂盒购于大连宝生物工程有限公司；ABI SybrGreen PCR Master Mix（2X）购自上海生工生物公司；RNA prep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒购于天根生化科技有限公司，引物合成及测序由上海生工生物公司完成；琼脂糖、卡那霉素（Kanamycin，KAN）、利福平（Rifampin，RIF）、头孢噻肟（Cefotaxime Sodium，CTX）等常规试剂与耗材购于国内生化试剂公司。

1.2 实验方法

1.2.1 烟草转化和鉴定

采用常规方法将 pEuCOMT-S、pEuCCoAOMT-RNAi、pEuCCoAOMT-EuCOMT 导入农杆菌 LBA4404。

无菌烟草叶片切成 0.5 cm^2 左右的小块，在 OD_{600} 值约 0.5 的农杆菌菌液中浸泡

侵染 10 min，取出后用无菌吸水纸吸取表面菌液，接种至共培养培养基中（MS 培养基+ 1.5mg/L 6-BA+ 0.1mg/L NAA），暗培养 3 天。将诱导出的愈伤组织转入分化培养基（MS 培养基+ 1.5mg/L 6-BA+ 0.1 mg/L NAA+ 100 mg/L KAN+200 mg/L CTX），并调整为光照 12 h/d。待两至三周后长出幼芽，剪取幼芽转移到壮苗培养基培养约一周左右（MS 培养基+ 0.1mg/L6-BA+ 0.01mg/L NAA + 100mg/L KAN+200 mg/L CTX）。挑选健壮的小苗移入生根培养基（1/2MS 培养基+ 0.01mg/L NAA + 50mg/L KAN+ 200 mg/L CTX），待根系萌发后选取健壮植株移栽至基质中，置于温室培养。

转化植株移栽培养 8 周后，选择中层部位的叶片用高效植物基因组提取试剂盒提取基因组 DNA（gDNA），分别用转化载体中携带基因的特异性引物 COMT-F1、COMT-R1、CCoAOMT-F1、CCoAOMT-R1 进行 PCR 鉴定，引物序列如表 1。

表 1 本研究所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列(5′to 3′)
COMT-F1	GGGACTAGTGGAGAGGAGAGAATGGGTTC
COMT-R1	GGGGTCGACGAGCAGATCAAGCAGTCTTC
CCoAOMT-F1	GGGGGTACCAGTTTGAATCAATGGCCACC
CCoAOMT-R1	GGGTCTAGATAGATGCTCAGCTGATCCGA
P-actin-F	CTGGAATCCATGAGACTACTTACAA
P-actin-R	AACCGCCACTGAGCACAATA
P-CCoAOMT-F	TTGAGGACGGCAAATACCAT
P-CCoAOMT-R	AGCCAAAGCCTTGTTGAGTTC
P-EuCOMT-F	AGAAGATACTGGAAACATACAAGGG
P-EuCOMT-R	TTTGGAACGCTGACGAACAT

1.2.2 基因表达水平检测

转基因植株培育 270 天后，自茎尖向下第 5 节处采集健康叶片组织用于基因表达水平检测，以同月龄的野生型做为对照。植物组织样品采用 RNA prep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒进行 RNA 提取，采用 RNA LA PCR 反转录试剂盒合成 cDNA。

采用烟草 *actin* 基因(EU938079)作为内参基因，烟草 *CCoAOMT* 基因(U62735.1)做为检测目标基因，利用 Vector NTI 软件设计引物 P-actin-F/P-actin-R、P-CCoAOMT-F/P-CCoAOMT-R，与 *EuCOMT* 基因的特异荧光定量检测引物 P-EuCOMT-F/P-EuCOMT-R 配合使用，通过荧光定量 PCR 检测基因表达水平，引物序列如表 1。

荧光定量 PCR 检测采用 ABI SybrGreen PCR Master Mix（2X）和 ABI Step one

plus 型荧光定量 PCR 仪完成。配制 20.0 μl 的荧光 PCR 反应体系（SybrGreen qPCR Master Mix (2X) 10.0 μl，cDNA 1.0 μl,F 引物 1.0 μl,R 引物 6.0 μl,ddH_20 2.0 μl），PCR 反应条件为 95℃ 预变性 2 min，循环设置包括 95℃ 变性 10 sec，60℃ 退火延伸 40 sec，重复 40 个循环。根据 $2^{-\triangle Ct}$ 值计算基因相对表达水平，每个样品荧光定量检测 3 次，结果用 SPSS(19.0)进行统计分析。

1.2.3 茎部木质素、纤维素含量检测

分别选取温室培育 270 天的对照及转基因烟草植株，取茎部顶端向下数第 3 节至第 15 节，摘去叶子，将茎杆切成小段，放置在 60℃烘箱中烘干 24 小时后，粉碎过 150 目筛，用于木质素和纤维素含量检测。

木质素含量测定采用 Klason 法测定[13]，纤维素含量采用硝酸法测定[14]。每个样品重复测定 3 次，测量结果采用 SPSS 19.0 进行统计分析。

1.2.4 茎部解剖结构分析

取温室培育 270 天的烟草茎部顶端向下数第五节和第七节茎部组织，按常规方法制成石蜡切片，并用番红-固绿法染色[15]。制好的切片用 Nikon 研究用光学显微镜进行观察，NIS-Elements 软件拍照并测量茎部直径。测量时每个样品选取 1 张切片，在茎部截面的各个方向分别采集茎部直径数据 60 个，测量结果采用 SPSS 19.0 进行统计分析。

另取茎部第 7 节组织的切片用于 Mäule 染色观察。切片经脱蜡后放入 1%高锰酸钾溶液中浸泡 5min；取出立即用流水冲洗 30s，洗去多余高锰酸钾溶液直至变为褐色。将切片平放，滴加 6N 盐酸溶液数滴，直至褐色退去；流水冲洗 10s，洗去多余盐酸溶液；将切片平放，滴加数滴 10%氨水 3min 后反应显色；盖上盖玻片，滤纸吸取多余氨水，用 Nikon 研究用光学显微镜进行观察，NIS-Elements 软件拍照并测量细胞面积、细胞壁厚度。测量时每个样品选取 1 张切片，在茎部截面的木质部中各个方向分别采集细胞面积和细胞壁厚度数据各 60 个，测量结果采用 SPSS 19.0 进行统计分析。

1.2.5 木质素单体含量检测

将 1.2.2 中制备的茎部组织粉末称取 5 g，参照 Tian 等[16]所述方法进行前处理，衍生化反应结束后取 1μL 衍生化产物，用于 GC-MS 分析。

GC-MS 分析采用 Trace-GC Ultra and Trace-DSQ GC-MS (Thermo-Finnigan）进行检测，色谱柱使用 DB-5 ms(30m×0.25 mm i.d., 0.25μm film thickness, Agilent)，色谱检测条件参照 Tian 所述方法。每个样品 GC-MS 分析 3 次，使用 calibur 2.0 工作站进行数据采集和分析。测量结果采用 SPSS 19.0 进行统计分析。

2.结果与分析

2.1 转基因烟草培育

烟草无菌叶片农杆菌侵染后，经共培养、分化、壮苗、生根、移栽等阶段的培

养后，每个载体获得约 80 株转基因烟草小苗。采集小苗叶片，用载体携带外源基因的特异性引物对小苗进行 PCR 鉴定，阳性植株中可扩增得到特异性片段，长度与预期相符（图 2），每个载体获得约 40 株左右的阳性植株。

阳性植株在生长上与野生型并没有明显差异，植株叶片展开，叶色翠绿，茎干挺直，温室培养 270 天后苗高达到 1.7 m 左右，培养 330 天后开花结实（图 3）。

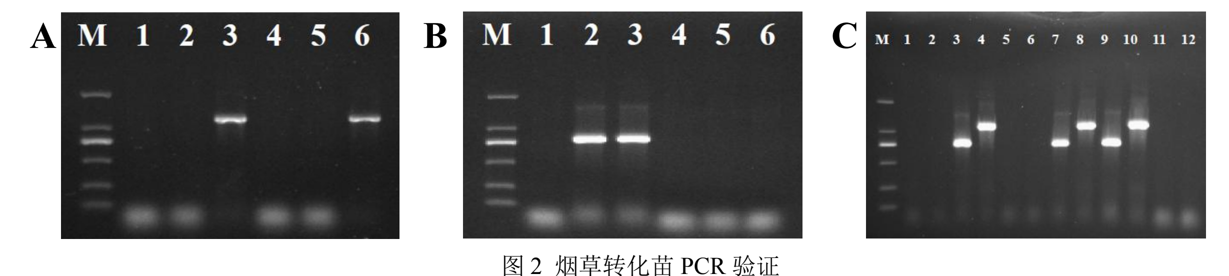


图 2 烟草转化苗 PCR 验证

Figure 2 PCR validation of transgenic tobacco seedling

A：M：D2000 Marker(TIANGEN)；1-6：pEuCOMT-S 载体转基因植株用 COMT-F1/COMT-R1 引物 PCR 鉴定结果，其中 3、6 为阳性植株；

B：M：D2000 Marker(TIANGEN)；1-6：pEuCCoAOMT-RNAi 载体转基因植株用 CCoAOMT-F1/ CCoAOMT-R1 引物 PCR 鉴定结果，其中 2、3 为阳性植株；

C：M：D2000 Marker(TIANGEN)；1、3、5、7、9、11：pEuCCoAOMT-EuCOMT 载体转基因植株用 CCoAOMT-F1/CCoAOMT-R1 引物 PCR 鉴定结果；2、4、6、8、10、12，：用 COMT-F1/COMT-R1 引物 PCR 鉴定结果，其中 3/4、7/8、9/10 对应植株为阳性植株；

A：M：D2000 Marker(TIANGEN)；1-6：PCR identification results of transgenic plants contain pEuCOMT-S vector with COMT-F1/COMT-R1 primers, 3 and 6 were positive plants.

B：M：D2000 Marker(TIANGEN)；1-6：PCR identification results of transgenic plants contain pEuCCoAOMT-RNAi vector with CCoAOMT-F1/ CCoAOMT-R1 primers, 2 and 3 were positive plants.

C：M：D2000 Marker(TIANGEN)；1、3、5、7、9、11：PCR identification results of transgenic plants contain pEuCCoAOMT-EuCOMT vector with CCoAOMT-F1/CCoAOMT-R1 primers：2、4、6、8、10、12：PCR identification results of transgenic plants contain pEuCCoAOMT-EuCOMT vector with COMT-F1/COMT-R1 primers，3/4、7/8 and 9/10 corresponding plant were positive plants.

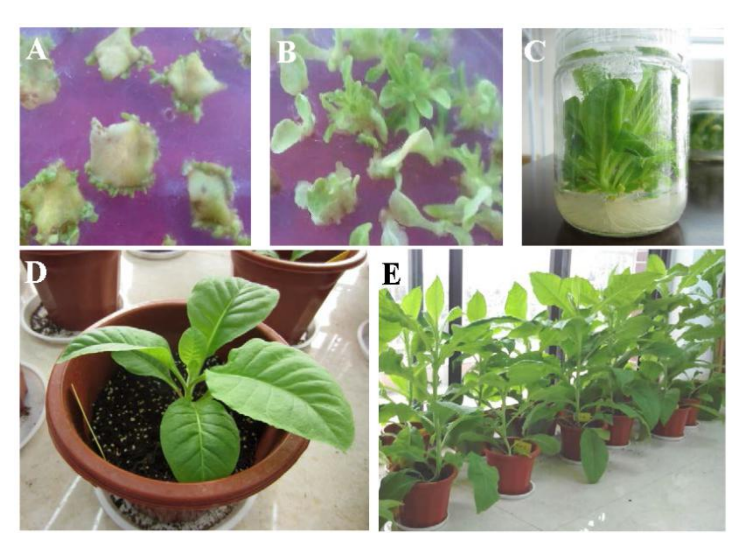




图 3 烟草遗传转化

Figure 3 Tobacco genetic transformation

A：愈伤组织分化出芽；B：小芽壮苗培养；C：转化苗生根培养；D：转化苗移栽培养；E：移栽培养 120 天的转化苗；F：移栽培养 270 天的转化苗 ；G：移栽培养 330 天后转化苗开花。

A：Callus differentiation；B：Bud strengthen cultivation；C：Rooting cultivation of transgenic plants；D：Transplanting of transgenic plants；E：Transgenic plants cultivated for 120 days；F：Transgenic plants cultivated for 270 days；G：Transgenic plants cultivated for 330 days blooming as normal.

2.2.2 基因表达水平检测

在对 C-S 植株（pEuCOMT-S 转化植株）进行检测时，除可以正常检测到 *actin* 基因外，也可检测到目标基因 *EuCOMT* 基因的表达信号，说明转入的基因在植株体内可以进行表达（图 4）。

将尾叶桉 *EuCCoAOMT* 序列与 GenBank 中收录的三条烟草 *CCoAOMT* 基因进行比对，序列覆盖率 92%，一致性 77%-78%， 两者序列同源性较高，推测其 RNAi 片段很可能对目标基因引发较强的抑制作用。在 CR（pEuCCoAOMT-RNAi 转化植株）和 C-CR（pEuCCoAOMT-EuCOMT 转化植株）中，检测到烟草 *CCoAOMT* 基因表达水平分别降低至野生型的 12%和 17%，说明转入的 *EuCCoAOMT* 的 RNAi 片段如预期显著抑制了烟草 *CCoAOMT* 基因的表达（图 4），同时在 C-CR（pEuCCoAOMT-EuCOMT 转化植株）中，可以检测到 *EuCOMT* 基因表达，但表达水平较 C-S 低近 50%。

以上结果显示，转入的正义或 RNAi 片段，分别上调或下调了目标基因的表达，并且在二价基因转化植株中，也实现对两个基因的同时调控效果，与预期效果相一致。

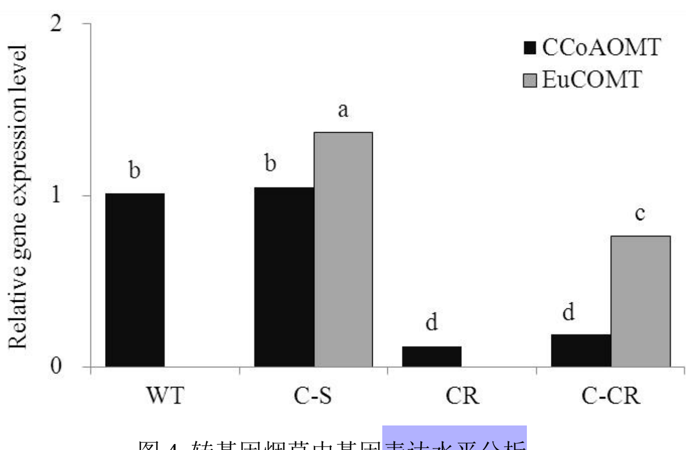


图 4 转基因烟草中基因表达水平分析

Figure 4 Effect of transforming on gene expression

Different letters represent a highly significant difference at 0.05 level.

2.2.3 茎部木质素、纤维素含量检测

采用 Klason 法和硝酸法测定转化植株茎部组织中木质素和纤维素含量（表 2），发现 C-S 中木质素含量与野生型差异不显著，其纤维素含量则提高 4.64%。CR-7 中木质素降低 4.15%并伴随纤维素含量降低 2.03%。二价基因转化的 C-CR 植株中，木质素较野生型显著降低，降幅达 7.01%。并伴随纤维素含量的小幅降低。

从木质素和纤维素的变化幅度来看，转基因植株中木质素的降低幅度都在 10%以下。以木质素为例，按野生型烟草中 13.26%的木质素含量计算，降幅最大植株中的也仅仅降低 0.93%，说明转入的基因片段并未对木质素和纤维素的合成造成重大影响。从生物学功能上来分析，COMT 和 CCoAOMT 在木质素合成中主要参与木质素单体之间的转化过程，并不是木质素合成总量的关键控制点，结合本研究的调控策略，推测其对木质素合成的影响主要体现在木质素单体比例上。

表 2 转基因烟草中木质素、纤维素含量

Table 2 Lignin and cellulose content in transgenic tobacco

植株编号	木质素含量（%）	纤维素含量（%）
WT	13.26±0.07 a	34.03±0.07 b
C-S	12.94±0.17 ab	35.61±0.05 a
CR	12.71±0.23 b	33.34±0.08 c
C-CR	12.33±0.31 c	33.74±0.11 d

Different letters in the same column represent a highly significant difference at 0.05 level.

2.2.4 茎部解剖结构分析

首先对茎部横切的直径进行了测量，结果显示，3 个转化植株和野生型之间，在第 5 节和第 7 节直径差异不显著，说明基因转化并未显著影响茎部的生长发育（表 3）。

将各植株茎部第 7 节石蜡切片进行 Mäule 染色，后在高倍镜下对木质部细胞的细胞面积和细胞壁厚度进行了测量（表 3），发现野生型与转基因植株中，茎部组织的细胞面积和细胞壁厚度差异不显著，说明外源基因的转化并没有显著影响细胞壁的生长、形成。对茎部细胞的形态观测发现（图 5），木质部细胞大多呈椭圆形或近长方形，摆列紧密，其间散落分布若干卵圆形或多边形的导管。这种排列紧密的结构，为植物提供了更强的支撑能力，各转基因植株在细胞形态上与野生型无明显差异，说明转基因操作并不会影响茎部的机械支撑功能。

Mäule 染色是一种特殊的显示反应，G 木质素不能染色，S 木质素则可以被特异

性的染成红紫色，红紫色的深浅程度可大致反映出 S 木质素的含量[17]。三个样品的显色反应目测与野生型并无差异，推测基因转化可能并未显著的影响 S 木质素单体的合成，而对 G 木质素合成的影响，则需要经过色谱检测加以确定。

表 3 转化植株茎部切片测量结果

Table 3 Measurement of stem section of transformed plants

植株编号	直径（μm）		细胞面积（μm^2）	细胞壁厚度（μm^2）
	第 5 节	第 7 节		
WT	6423.10±342.95a	8218.97±334.28a	135.46±42.30 a	2.29±0.44 a
C-S	6514.79±411.19a	8114.65±315.10a	140.53±53.92 a	2.33±0.61 a
CR	6220.02±471.10a	7928.96±374.35a	140.98±41.12 a	2.41±0.54 a
C-CR	6606.09±265.25a	8444.17±267.36a	131.16±47.40 a	2.49±0.62 a

Different letters in the same column represent a highly significant difference at 0.05 level.

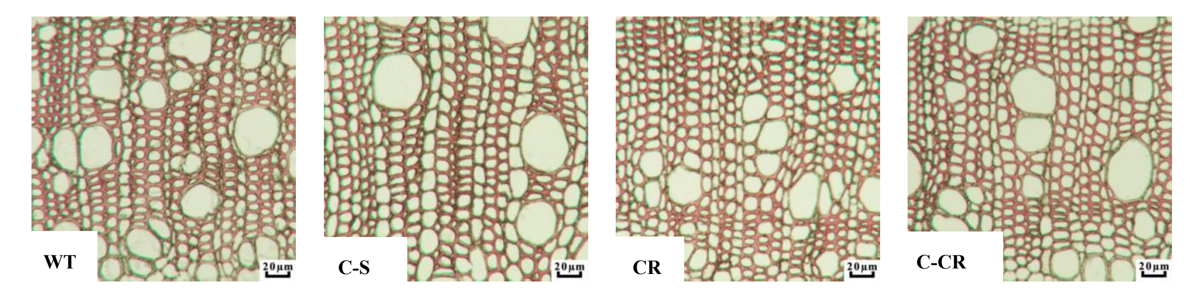


图 5 木质部 Mäule 染色

Figure 5 Mäule stain of xylem

2.2.5 木质素单体含量检测

采用 GC-MS 对茎部组织中 G、S 木质素含量进行测定，参照内标正二十四烷含量计算样品 G、S 木质素含量。结果显示，参试的三个转基因植株中，S 木质素含量与野生型无显著差异，这与切片显色反应结果相一致。

对 G 木质素含量比较分析发现，CR 中 G 木质素显著降低，S/G 比值升高 61.62%（表 4），说明 EuCCoAOMT 正如预期，主要影响了 G 木质素的合成，这与其普遍认可的功能相符。C-S 中 G 木质素含量比野生型升高 17.72%，S/G 比值降低 17.99%，说明转化正义 *EuCOMT* 基因使植株中 G 木质素被大量合成，但似乎并未影响 S 木质素合成，这与预期调控效果相差较大。在二价基因转化的植株 C-CR 中， G 木质素降幅达到 57.38%，S/G 比值升高幅度更大，达到 114.94%，说明在对 COMT 上调的同时下调 CCoAOMT 定向提高 S/G 比值的调控效果最为理想。

表 4 转基因烟草茎部木质素单体含量分析

Table 4 Analysis of lignin monomer content in stem of transgenic plants

植株编号	G 木质素单体含量	S 木质素单体含量	S/G
WT	9.23±0.60 b	8.03±0.49 a	0.87±0.01 c
C-S	10.87±0.10 a	7.75±0.45 a	0.71±0.04 c
CR	5.28±0.31 c	7.43±0.56 a	1.41±0.05 b
C-CR	3.93±0.28 d	7.36±0.45 a	1.87±0.24 a

Different letters in the same column represent a highly significant difference at 0.05 level.

3.讨论

脱木素是制浆过程中的重要步骤，过程中造成的环境污染和生产损耗直接影响到造纸成本。另一方面，木质素做为细胞壁的主要成份，起到了机械支撑的作用，并在营养运输、防御病害方面具有重要意义[18,19,20]，单纯的降低纸浆材中的木质素含量，可能会对植物造成不利，更为适宜的研究策略是对木质素单体比例进行定向调控。

本研究采用正义和全长 RNAi 手段，对 *COMT* 和 *CCoAOMT* 进行调控，对转基因植株的检测结果证实目标基因的表达水平如预期的达到了上调和下调的效果。通过对转基因烟草的生长形态、木质素、纤维含量以及解剖结构的观测，证实基因调控并未显著影响植物的生长发育，以及茎部的组织结构和功能，解除了前述的顾虑，这对下一步在尾叶桉中的基因工程研究具有参考意义。

在木质素单体合成途径中，有两处甲基化反应，分别是咖啡酸系列衍生物的 3-位点甲基化和 5 羟阿魏酸系列衍生物的 5-位点甲基化。其中 3-位点甲基化的产物之一的松柏醛处于 G、S 木质素的分流节点，可经阿魏酸脱氢酶（F5H）催化流向 S 木质素合成，或经肉桂醇脱氢酶（CAD）催化形成 G 木质素前体。松柏醛的供给有两条渠道，一是由咖啡酸 CoA 经肉桂酰 CoA 还原酶(CCR)还原为咖啡醛后，再经 COMT 甲基化形成；另一来源是由 CCoAOMT 催化咖啡酸 CoA 形成阿魏酸 CoA 后由 CCR 还原而成。Lee 等[8]将两条途径以“CCoAOMT-CCR1”和“CCR2-COMT”加以区分。

茎部细胞中的标记实验发现，“CCR2-COMT”途径中下游的催化酶 F5H 锚定于内质网表面[21]，并且与 COMT 共定位，合成的松柏醛更易于直接被邻近的 F5H 利用流向 S 木质素合成，而不转向 G 木质素的合成。酶动力学结果显示，在野生型和 COMT 抑制植株中，“CCoAOMT-CCR1”中 CCR1 催化的反应速率与其下游 CAD 催化的松柏醛脱氢反应速率呈正相关，而 CCoAOMT 受抑制的植株中则失去了这种关联[10]，提示流向 G 木质素合成的松柏醛主要由“CCoAOMT-CCR1”途径供给。这暗示自然状态下，两条途径合成的松柏醛实际上并不会发生交换，它们各自独立的进入了下游合成链中。

两条途径中的 3-位点的甲基化分别由 COMT 和 CCoAOMT 催化，但对目标基因下调的效果却不尽相同，抑制 COMT 的植株中 S 木质素降低较为显著[2,3]，而抑制 CCoAOMT 对 G 木质素合成影响更大[7,12,22]。“CCoAOMT-CCR1”途径中的两个基因

的抑制转化植株中表型类似，都呈现出 G 木质素相对 S 木质素更大幅度的降低[4,21]。

本研究结果中，*COMT* 基因上调，“CCR2-COMT”途径得到增强，推测会促进松柏醛合成，但一方面由于 F5H 的限速效应[21]，另一方面由于 COMT 具有对咖啡醛的底物偏好性[4]，最终结果并未显著地影响到 S 木质素的合成，而是造成了 G 木质素合成水平提高。

当同时调控 *COMT* 和 *CCoAOMT* 两个基因时，意在增强“CCR2-COMT”途径并削弱“CCoAOMT-CCR1”途径。从调控结果来看，后者的调控效果更为显著，导致了 G 木质素的急剧下降，并未因为 COMT 对 G 木质素合成的促进而得到补偿，推测可能与本研究中二价基因转化植株中 COMT 的表达水平较低，减弱了这种促进作用有关，也可能是二价基因转化引发了某种尚未明确的替代途径促进了咖啡醛及其衍生物向 5-羟松柏醛及其衍生物的转化。同时提示，木质素合成的网络状多途径特点，使得对其中的多个位点同时调控时，结果往往不是单独调控效果的简单加成，催化酶之间的相互作用是不得不考虑的重要因素。

通过本研究发现，抑制 *CCoAOMT* 和二价基因转化这两种调控方式，都达到了提高 S/G 比值的预期目标，而后者调控效果更为理想，研究结果对下一步尾叶桉的木质素合成定向调控提供了研究基础。但值得注意的是，这两种调控模式的转基因植株中，S 木质素与野生型持平，G 木质素含量降低，但木质素总量却与野生型差异不显著，这暗示木质素中可能掺入了 S、G 以外的单体组份。从合成途径推测，转基因植株中很可能出现 5-羟松柏醛积累，并随之形成 5-羟 G 木质素单体。所以，在后续研究中，须针对转基因植株中的 5-羟松柏醛和 5-羟 G 木质素进行检测，才能更全面的评价基因转化对木质素的调控效果。

参考文献

[1] 何柏华, 付强, 曾嵘. 广西南部桉树工业原料林立地质量评价. 广西林业科学, 2017, 46(3).
He B H, Fu Q, Zend R. Site Quality Evaluation of Eucalyptus Industrial Raw Material Forest in Southern Guangxi. Guangxi Forestry Science. 2017, 46(3).

[2] 黎怀玲, 付朝阳, 廖仁雅,等. 6 年生杂交桉无性系对比试验. 广西林业科学, 2016, 45(2):195-198.
Li H L,Fu C Y, Liao R Y, et al. A Comparison Trial of 6-Year-Old Hybrid Eucalyptus Clones. Guangxi Forestry Science. 2016, 45(2):195-198.

[3] 赵艳玲. 正义、反义和 RNA 干扰技术调控杨树木质素生物合成途径. 2006. 北京林业大学.
Zhao Y L. Modulation of Lignin Biosynthesis of Poplar by Sense, Antisense and RNA Interference Technology. 2006. Beijing Forestry University.

[4] Trabucco GM, Matos DA, Lee SJ, Saathoff AJ, Priest HD, Mockler TC, Sarath G, Hazen SP. Functional Characterization of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase and Caffeic Acid O-Methyltransferase in *Brachypodium Distachyon*. Bmc Biotechnology. 2013. 13(1): 1-18.

[5] Tu Y, Rochfort S, Liu Z, Ran Y, Griffith M, Badenhorst P, Louie GV, Bowman ME, Smith KF, Noel JP, Mouradov A, Spangenberg G. Functional Analyses of Caffeic Acid O-Methyltransferase and

Cinnamoyl-Coa-Reductase Genes from Perennial Ryegrass (*Lolium Perenne*). Plant Cell. 2010. 22(10): 3357-3373.

[6] Guo D, Chen F, Inoue K, Blount JW, Dixon RA. Downregulation of Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase and Caffeoyl Coa 3-O-Methyltransferase in Transgenic *Alfalfa*. Impacts on Lignin Structure and Implications for the Biosynthesis of G and S Lignin. Plant Cell. 2001. 13(1): 73-88.

[7] Piquemal J, Chamayou S, Nadaud I, Beckert M, Barrière Y, Mila I, Lapierre C, Rigau J, Puigdomenech P, Jauneau A. Down-Regulation of Caffeic Acid O-Methyltransferase in Maize Revisited Using a Transgenic Approach. Plant Physiology. 2003. 130(4): 1675-1685.

[8] Zhong R, Himmelsbach DS, Ye ZH. Essential Role of Caffeoyl Coenzyme a O-Methyltransferase in Lignin Biosynthesis in Woody Poplar Plants. Plant Physiology. 2000. 124(2): 563-577.

[9] 魏建华，王彦珍，王宏芝，等．抑制 *CCoAOMT* 表达的转基因杨树的制浆性能．科学通报．2008.(21): 2612-2616.

Wei J H, Wang Y Z, Wang H Z, et al. Pulping properties of Transgenic Poplar with inhibition of CCoAOMT expression. Chinese science bulletin. 2008.(21): 2612-2616.

[10] Lee Y, Chen F, Gallegogiraldo L, Dixon RA, Voit EO. Integrative Analysis of Transgenic Alfalfa (*Medicago Sativa* L.) Suggests New Metabolic Control Mechanisms for Monolignol Biosynthesis. Plos Computational Biology. 2011. 7(5): e1002047.

[11] Zhou R. Distinct Cinnamoyl Coa Reductases Involved in Parallel Routes to Lignin in *Medicago Truncatula*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010. 107(41): 17803-17808.

[12] 赵华燕，张景昱，刘惠荣，等．抑制 *COMT* 与 *CCoAOMT* 调控植物木质素的生物合成．科学通报. 2002. 47(8): 604-607.

Zhao H Y, Zhang J Y, Liu H R, et al.. Regulation of lignin synthesis by inhibition of COMT and CCoAOMT. Chinese science bulletin. 2002. 47(8): 604-607.

[13] 陈洪章．纤维素生物技术．北京：化学工业出版社, 2005．

CHEN H Z. Cellulosic Biotechnology. Beijing: Chemical Industry Press. 2005.

[14] 王林风，程远超．硝酸乙醇法测定纤维素含量．化学研究, 2011, 22(4):52-55.

Wang L F, Cheng C Y. Determination the content of cellulose by nitric acid-ethanol method. Chemical Research. 2011, 22(4):52-55.

[15] 李正理．植物制片技术．北京：科学出版社, 1987.

Li Z L. Plant sectioning technique. Beijing: Science Press, 1987.

[16] Tian X, Xie J, Zhao Y, et al. Sense-, antisense- and RNAi-4CL1 regulate soluble phenolic acids, cell wall components and growth in transgenic Populus tomentosa Carr. Plant Physiology & Biochemistry Ppb, 2013, 65(6):111.

[17] 邓建华，管梦灵，刘美芹．高粱茎杆中木质素分布的显微技术研究．植物学研究. 2014. 03:

188-194.

Deng J H, Guan M L, Liu M Q.Study on Microscopy Techniques for Identifying Lignin Distribution in the Stem of Sorghum. Botanical Research, 2014 , 03 :188-194.

[18] Barros-Rios J, Malvar RA, Jung HJG, Santiago R. Cell Wall Composition as a Maize Defense Mechanism against Corn Borers. Phytochemistry. 2011. 72(4-5): 365-371.

[19] Lothar K, Frankw T. Biomechanics and Transgenic Wood. American Journal of Botany. 2006. 93(10): 1433-1438.

[20] Buanafina MM, Fescemyer HW. Modification of Esterified Cell Wall Phenolics Increases Vulnerability of Tall Fescue to Herbivory by the Fall Armyworm. Planta. 2012. 236(2): 513-523.

[21] Meyermans H. Modifications in Lignin and Accumulation of Phenolic Glucosides in Poplar Xylem Upon Down-Regulation of Caffeoyl-Coenzyme a O-Methyltransferase, an Enzyme Involved in Lignin Biosynthesis. Journal of Biological Chemistry. 2000. 275(47): 36899.

[22] Chapple C. Molecular-Genetic Analysis of Plant Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases. Annual Review of Plant Biology. 1998. 49(1): 311.

[23] Jackson LA, Shadle GL, Zhou R, Jin N, Chen F, Dixon RA. Improving Saccharification Efficiency of *Alfalfa* Stems through Modification of the Terminal Stages of Monolignol Biosynthesis. BioEnergy Research. 2008. 1(3): 180.